

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005年8月25日 (25.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/078085 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, C07K 14/78, C12P 21/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/001583

(22) 国際出願日: 2005年2月3日 (03.02.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-038612 2004年2月16日 (16.02.2004) JP(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会  
社テクノネットワーク四国 (TECHNO NETWORK  
SHIKOKU CO., LTD.) [JP/JP]; 〒7600033 香川県高松  
市丸の内2番5号 Kagawa (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 小出 隆規  
(KOIDE, Takaki) [JP/JP]; 〒9502076 新潟県新潟市上  
新栄町4-7-4 3 Niigata (JP).(74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1006036  
東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 霞が関ビル  
36階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護  
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,  
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

## 添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部  
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイドスノート」を参照。

(54) Title: POLYPEPTIDE HAVING COLLAGEN-LIKE STRUCTURE

(54) 発明の名称: コラーゲン様構造を有するポリペプチド

(57) **Abstract:** A peptide trimer in which three peptides of the same chain length having a repeating unit represented by the following general formula as the fundamental structure are aligned in the main chain direction out of line to each other so that the amino acid side chains of the peptides are bonded together via, for example, disulfide bonds: general formula  $-(\text{Gly-X-Y})-$  wherein X and Y represent each an arbitrary amino acid residue. This peptide trimer can form a polypeptide having a collagen-like triple-helix structure. A method of producing this peptide trimer, and an aggregate of collagen-like molecules having a triple-helix structure which carry the above-described peptide trimer units as the constitutional units.

(57) 要約: 式:  $-(\text{Gly-X-Y})-$  [式中、XおよびYは任意のアミノ酸残基を表す] の繰り返し単位を基本構造として有する同一鎖長の3個のペプチドが主鎖方向に互いにずれてアミノ酸側鎖どうしがジスルフィド結合などにより結合されているペプチド3量体が開示される。このペプチド3量体は、コラーゲン様の3本らせん構造を有するポリペプチドを形成することができる。また、本発明のペプチド3量体を製造する方法、ならびに本発明のペプチド3量体ユニットを構成単位とする、3本らせん構造を有するコラーゲン様分子集合体も開示される。

WO 2005/078085 A1

## 明 細 書

## コラーゲン様構造を有するポリペプチド

## 技術分野

[0001] 本発明は、コラーゲン様の3本らせん構造を有するポリペプチド、このようなポリペプチドを製造するためのペプチド3量体、ならびにポリペプチドおよびペプチド3量体の製造方法に関する。

## 背景技術

[0002] コラーゲンは、医薬品や化粧品の基材、再生医学やドラッグデリバリーシステム用の生体適合性材料、組織培養用の支持体などとして広く用いられている。現在利用されているコラーゲンは、主としてブタ、ウシなどの動物から得たコラーゲンを精製したものである。しかし、家畜由来コラーゲンをヒトに利用する場合には、BSEの原因となるプリオン感染の危険性が問題となっている。また、植物や魚皮由来コラーゲンも利用されるようになってきたが、異種コラーゲンの摂取によるゼラチンアレルギーの危険性が伴う。したがって、安全なコラーゲン代替品の供給が求められている。最近、さまざまなホスト生物を利用した遺伝子組み換えヒト型コラーゲン産生系の構築が試みられているが、まだ実用化には至っていない。

[0003] コラーゲンは、3本のポリペプチド鎖が長い3本らせんを形成している構造を有する。コラーゲン様配列を有する3本の化学合成ペプチドが自己集合してコラーゲンと同じ3本らせん構造をとることはよく知られており、コラーゲンの構造研究に利用されている。コラーゲン様ポリペプチドとしては、例えば、ペプチドユニット $[-(Pro-Y-Gly)n-]a$ (式中、YはProまたはHypを表し、nは1-20の整数を表す)と、ペプチドユニット $[-(Z)r-]b$ (式中、Zは1-10個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖を表し、rは1-20の整数を表す)とを含む繰り返し単位で構成されたポリペプチドが開示されている(特開2003-321500)。また、コラーゲン様ペプチド配列からなる超分子としては、これまでに、Martinらのコラーゲントリロックペプチド:(Glu)<sub>5</sub>(Gly-X-Hyp-Gly-Pro-Hyp)<sub>6</sub>(Glu)<sub>5</sub>(Martin, R. et al. Biopolymers 70, 435-444, 2003)や、Fieldsによる"peptide-amphiphile" (Fields, GB, Bioorg. Med. Chem. 7, 75-81, 1999)が報告されてい

る。

[0004] しかし、これまでに、分子間での相補的3本らせん形成により、3本らせん軸方向に伸長した超分子を作成した例は報告されていない。

[0005] 本発明は、コラーゲン様の3本らせん構造を有するポリペプチドおよびこのようなポリペプチドを製造するためのペプチドユニットを提供することを目的とする。

## 発明の開示

[0006] 本発明は、式：

$-(\text{Gly}-\text{X}-\text{Y})-$

[式中、XおよびYは任意のアミノ酸残基を表す]

の繰り返し単位を基本構造として有する同一鎖長の3個のペプチドが、主鎖方向に互いにずれて結合されているペプチド3量体を提供する。好ましくは、前記3個のペプチドは、ジスルフィド結合により互いに結合されている。

[0007] 別の態様においては、本発明は、上述の本発明のペプチド3量体を製造する方法を提供する。この方法は、

1個のCysを有する第1のペプチド、2個のCysを有し、その一方のSH基が保護されている第2のペプチドおよび1個のCysを有する第3のペプチドを用意し、第1のペプチドと第2のペプチドとをジスルフィド結合により結合させてペプチド2量体を形成し、

第2のペプチドの保護されたSHを保護基変換により活性化し、そして前記ペプチド2量体と第3のペプチドとをジスルフィド結合により結合させる、の各工程を含む。

[0008] また別の態様においては、本発明は、上述の本発明のペプチド3量体を構成成分とする3本らせん構造を有する分子集合体を提供する。本発明はさらに、上述の本発明の分子集合体を製造する方法であって、ペプチド3量体の溶液を0°C–40°Cの範囲の温度で1時間以上放置することを特徴とする方法を提供する。

## 図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、本発明のペプチド3量体およびこれを構成単位とするコラーゲン様3本らせんを有する分子集合体の概略図である。

[図2]図2は、本発明のペプチド3量体の種々の構造を示す。

[図3]図3は、本発明のペプチド3量体およびこれを構成単位とする分子集合体のアミノ酸配列の一例を示す。

[図4]図4は、本発明にしたがって作成した分子集合体の円二色性スペクトルの測定結果を示す。

[図5]図5は、本発明にしたがって作成した分子集合体の限外濾過膜透過性を示す。

[図6]図6は、本発明のペプチド3量体の別の態様を示す。

[図7]図7は、本発明にしたがって作成した分子集合体の粒度分布を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明は、コラーゲン様配列を有する合成ペプチドを位置選択的架橋形成により3量体化させて形成したペプチド3量体ユニットを提供する。本発明はまた、このペプチド3量体ユニットを構成単位とし、3本らせん構造を有する超分子を作成する方法を提供する。本発明の概要は図1に示される。

#### [0011] ペプチド3量体ユニットの構造

本発明のペプチド3量体ユニットは、式:

$-\text{(-Gly-X-Y-)}-$

[式中、XおよびYは任意のアミノ酸残基を表す]

の繰り返し単位を基本構造として有する。天然のコラーゲンを構成するポリペプチド鎖は、 $-\text{(-Gly-Pro-Pro-)}-$ または $-\text{(-Gly-Pro-Hyp-)}-$ の繰り返し単位をその基本構造として有しており、長い左巻きらせんを形成する。3本のポリペプチド鎖は互いに巻き合って、鎖間の水素結合により長く伸びた右巻きらせん構造を形成することができる。また、 $-\text{(-Gly-Pro-Pro-)}-$ または $-\text{(-Gly-Pro-Hyp-)}-$ の繰り返し単位を有する鎖長15-30程度のペプチドの溶液を放置しておくと、天然のコラーゲンと同様の安定な3本らせん構造をとることが知られている。本明細書においては、このような3本らせん構造を「コラーゲン様構造」と称する。

[0012] 本発明のペプチド3量体ユニットは、3個のペプチドから構成され、それぞれのペプチドは、 $-\text{(-Gly-X-Y-)}-$ [式中、XおよびYは任意のアミノ酸残基を表す]の繰り返し単位からなる基本構造を有する。ここで、XおよびYは、天然のアミノ酸残基でもよく、当

該技術分野においてよく知られる修飾アミノ酸残基でもよく、L体でもD体でもよい。好ましくは、本発明のペプチド3量体は、天然のコラーゲンに見いだされる $-(\text{Gly}-\text{Pro}-\text{Pro})-$ または $-(\text{Gly}-\text{Pro}-\text{Hyp})-$ の繰り返し単位を多く含み、例えば、ペプチド3量体分子全体で、Xの30%以上がProであり、Yの30%以上がProまたはHypである。しかし、 $(\text{Gly}-\text{Glu}-\text{Arg})_n$  (Mechling, DE. et al, J. Biol. Chem. 275, 14352–14356, 2000)、 $(\text{Gly}-\text{Pro}-\text{Nleu})_n$  (Nleu = N-イソブチルグリシン; Goodman, M. et al, J. Am. Chem. Soc. 118, 10928–10929, 1996)なども安定な3本らせん構造を形成することが知られており、本発明のペプチド3量体はこのような繰り返し単位を有していてもよい。ペプチドが、「 $-(\text{Gly}-\text{X}-\text{Y})-$ の繰り返し単位からなる基本構造を有する」とは、ペプチドのすべてのアミノ酸配列が $-(\text{Gly}-\text{X}-\text{Y})-$ の繰り返し単位を有する(すなわち3番目ごとにGlyを有する)必要はなく、このような繰り返し単位を有しない部分を含んでいてもよいことを意味する。ただし、安定な3本らせん構造をとるために、ペプチド3量体分子中の80%以上、好ましくは90%以上のアミノ酸配列が $-(\text{Gly}-\text{X}-\text{Y})-$ の繰り返し単位を有していることが必要である。

[0013] 本発明のペプチド3量体ユニットは、同一鎖長の3個のペプチドが主鎖方向に互いにずれてアミノ酸側鎖どうしが結合されている構造を有する。ここで、「主鎖方向に互いにずれて」いるとは、3個のペプチドが完全に重なり合わないように結合されていることを意味し、例えば図2に示される種々の構造が考えられる。3個のペプチドを主鎖方向に互いにずれるように結合させることにより、3個のペプチドどうしが短い安定な3本らせん構造をとることを防止し、ペプチド3量体をユニットとする長い3本らせん構造を形成させることができる。このとき、ペプチド3量体中の1本鎖または2本鎖の部分は、複数のペプチド3量体を水素結合により安定に保持するのりしろの役割をはたす。したがって、本発明においては、図2に示される構造のうち、1本鎖または2本鎖の領域が長く、3本鎖の領域が短い構造がより好ましい。

[0014] 本発明のペプチド3量体ユニットを構成する各ペプチドは同一の鎖長を有する。このことにより、ペプチド3量体が集合して3本らせん構造を形成するときに、ギャップのない安定な構造をとることができる。各ペプチドは、公知のペプチド合成法(液相法あるいは固相法)によって合成することができる。鎖長は10–60アミノ酸残基、好ましく

は15–40残基、より好ましくは20–30残基である。鎖長が短いと形成される3本らせん構造の安定性が低くなり、鎖長が長いとペプチド合成のコストが高くなる。

[0015] 本発明のペプチド3量体ユニットにおいては、好ましくは3個のペプチドのアミノ酸側鎖どうしが結合されている。好ましくは、3個のペプチドは適切な位置にCysを有しており、これらのペプチドはジスルフィド結合により互いに結合されている。あるいは、アミド結合、スルフィド結合、シップ塩基結合などによりアミノ酸側鎖どうしを共有結合により結合させてもよい。

[0016] ペプチド3量体ユニットの合成法

本発明のペプチド3量体ユニットは、部位特異的ジスルフィド結合形成法(Ottl, J et al., FEBS Lett, 398, 31–36, 1996; Ottl, J. and Moroder, L. , J. Am. Chem. Soc. 121, 653–661, 1999; Koide, T. et al. Bioorg Med Chem Lett. 14, 125–128, 2004)により鎖間ジスルフィド結合を形成させることにより製造することができる。簡単には、ペプチド3量体を構成する3個のペプチド鎖のうち、2個は1残基のCys残基を、1個は2残基のCys残基を有するように設計し、Cys側鎖をジスルフィド結合によって他の鎖のCysと結合させる。

[0017] この方法では、まず、1個のCysを有する第1のペプチド、2個のCysを有し、その一方のSH基が保護されている第2のペプチドおよび1個のCysを有する第3のペプチドを合成する。SH基の保護基としては、ペプチド合成の分野において知られる保護基のいずれを用いてもよいが、例えば、アセトアミドメチルを用いることができる。次に、第1のペプチドと第2のペプチドとをジスルフィド結合により結合させてペプチド2量体を形成する。CysのSH基どうしをジスルフィド結合により結合させる方法は当該技術分野において一般に知られており、例えば、一方のペプチド鎖上のSH基をピリジンスルフェニル化またはニトロピリジンスルフェニル化した後に、両方のペプチドを反応させることにより、Cys残基が互いにジスルフィド結合したペプチド2量体を形成することができる。次に、ペプチド2量体の第2のペプチドの保護されたSHを保護基変換により活性化し、そして前記ペプチド2量体と第3のペプチドとを同様にしてジスルフィド結合により結合させることにより、本発明のペプチド3量体を得ることができる。本発明のペプチド3量体は、必要に応じて、カラムクロマトグラフィー、HPLC等により精製す

ることができる。

[0018] コラーゲン様分子集合体の構造および生成

本発明のコラーゲン様分子集合体(超分子)は、本発明のペプチド3量体ユニットをその構造単位とし、コラーゲンと同様の3本らせん構造を有する線維状の構造を持つ(図1、3)。上述の本発明のペプチド3量体ユニットの溶液を低温で放置すると、3本らせん形成を駆動力とする相補的自己集合がおこる。すなわち、本発明の分子集合体は、上述の本発明のペプチド3量体ユニットを含む溶液を0°C–40°C、好ましくは0°C–10°Cで、1時間以上、好ましくは12時間以上、さらに好ましくは48時間以上放置することにより形成することができる。溶液としては水溶液が好ましいが、コラーゲン3本らせん構造には他の多くのタンパク質に存在する疎水的コアが存在しないため、有機溶媒の使用も可能である。

[0019] コラーゲン様3本らせん構造を有する分子集合体が生じているか否かは、円二色性スペクトル測定による生成物の構造解析、分子量の測定、電子顕微鏡による直接観察などにより確認することができる。

[0020] 本発明のコラーゲン様分子集合体は、現在天然コラーゲンが利用されているあらゆる分野において利用することができる。例えば、細胞培養基剤、ドラッグデリバリーシステム、その他の生体適合性材料として使用することができる。本発明のコラーゲン様分子集合体は、現在天然コラーゲンの使用において問題となっている、BSEの原因となるプリオൺ感染の危険やゼラチンアレルギーの危険がないという利点を有する。

[0021] さらに、本発明のペプチド3量体を適切に設計することにより、天然のコラーゲンに存在する特定の機能性配列を本発明のコラーゲン様分子集合体中に容易に人工的に組み込むことができる。このため、本発明のコラーゲン様分子集合体は、コラーゲンの機能解析や、機能性人工コラーゲンの開発に利用することができる。また、特定の機能(特定のタンパク質結合に対する結合能)を有するコラーゲン様超分子、例えば、COIDE法(Yasui, N. and Koide, T., J. Am. Chem. Soc. 125, 15728–15729, 2003)によって同定される色素上皮由来因子(PEDF)結合配列をもつコラーゲン様超分子などの作成が可能である。

[0022] 以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

[0023] 以下の実施例においては、アミノ酸は全てL-体を使用した。最終生成物および合成中間体の精製には、全て高速液体クロマトグラフィーを用いた。条件は以下の通りである：

カラム:Cosmosil 5C18-AR

溶媒:A, 0.05%トリフルオロ酢酸／水

B, 0.05%トリフルオロ酢酸／アセトニトリル

温度:42°C

溶出はAからBへの直線グラジエントによりおこなった。また、最終生成物および合成中間体はMALDI-TOF MSにより同定した。

### 実施例 1

[0024] Pro-Hyp-Gly繰り返しを基本配列とするペプチドユニットの合成(図3)

1)ペプチド鎖の構築

N-ペプチド(SH体)：

H-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Cys(SH)-OH (配列番号1)

M-ペプチド(Acm, SH体)：

H-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Cys(Acm)-Cys(SH)-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-OH (配列番号2)

C-ペプチド(SH体)：

H-Cys(SH)-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-OH (配列番号3)

[0025] 上記3種のペプチド鎖は、TrtA-PEG-樹脂(渡辺化学工業)上、通常のFmoc型固相合成法により構築した。側鎖官能基保護アミノ酸として、Fmoc-Hyp(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OHおよびFmoc-Cys(Trt)-OHを使用した(略号:HypまたはO, 4-ヒドロキシプロリン; Acm, アセトアミドメチル; Trt, トリチル)。

[0026] 2)ペプチドの樹脂からの切り出しと脱保護

それぞれのペプチド-樹脂(約0.1mmol)を、氷冷下、水、m-クレゾール、チオアニソール(各0.25 ml)、1,2-エタンジチオール(0.125 ml)、トリフルオロ酢酸(4.125 ml)と混合し、室温で1時間攪拌した。切り出されたペプチドは、約5倍容のエーテルを加えることにより沈澱した。凍結乾燥したペプチドは、0.05%トリフルオロ酢酸／水に溶解し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって精製し、凍結乾燥した。

## 実施例 2

### [0027] 選択的ジスルフィド架橋によるペプチド3量体ユニットの合成

#### 1) M-ペプチドのピリジンスルフェニル化:M-ペプチド(Acm, SPy体)の合成

M-ペプチド(Acm, SH体)25mg (11.2  $\mu$  mol)を2 mM EDTAを含む50 mM酢酸ナトリウム(pH 5.4)[バッファー A]に溶解し、2,2'-ジピリジルジスルフィド(49.5 mg, 225  $\mu$  mol)を溶解した2-プロパノールと窒素雰囲気下、室温で混合し、1時間反応させた。生成した目的物は、HPLCにて精製し、凍結乾燥した。

### [0028] 2) M-ペプチド(Acm, SPy体)とC-ペプチド(SH体)とのヘテロ2量体化によるM-Cダイマー(Acm, SS体)の合成

13.2 mg (5.66  $\mu$  mol)のM-ペプチド(Acm, SPy体)を0.66 mlのバッファー Aに溶解し、これを14.7 mg (6.79  $\mu$  mol)のC-ペプチド(SH体)を溶解した0.735 mlのバッファー Aに室温、窒素雰囲気下で滴下した。反応液は遮光し、80分攪拌した。生成した目的物は、HPLCにて精製し、凍結乾燥した。

### [0029] 3) M-Cダイマー(Acm, SS体)の選択的S-ニトロピリジンスルフェニル化:M-Cダイマー(Npys, SS体)の合成

10.3 mg (2.35  $\mu$  mol)のM-Cダイマー(Acm, SS体)を0.412 mlのトリフルオロ酢酸／酢酸(1:2, v/v)に溶解する。3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニルクロリド(1.1 mg, 5.87  $\mu$  mol)も同様に0.6 mlのトリフルオロ酢酸／酢酸(1:2, v/v)に溶解し、ペプチド溶液に室温、窒素雰囲気下滴下した。反応液は遮光し、45分間攪拌した。生成した目的物は、HPLCにて精製し、凍結乾燥した。

### [0030] 4) M-Cダイマー(Npys, SS体)とN-ペプチド(SH体)間での選択的ジスルフィド架橋形成による、ペプチド3量体ユニットの合成

3.9 mg (1.81  $\mu$  mol)のN-ペプチド(SH体)を0.39 mlのBuffer Aに溶解し、これを8.1

mg (1.81  $\mu$  mol)のM-Cダイマー (Npys, SS体)を溶解した0.81 mlのBuffer Aに室温、窒素雰囲気下で滴下した。反応液は遮光し、90分攪拌した。生成した目的物は、HPLC (4.6 id x 250 mm)にて精製し、凍結乾燥した。合成したペプチド3量体ユニットはMALDI-TOF MSにより目的物であることを確認した。実測値( $M+H$ )<sup>+</sup> 6458, 理論値( $M+H$ )<sup>+</sup> 6458。

### 実施例 3

#### [0031] 自己集合による超分子形成

ペプチド3量体ユニットを10 mg/mlの濃度で水に溶解し、4°Cにて14日間放置した(ストック溶液)。

##### 1) 円二色性スペクトル測定による構造解析

上記ストック溶液を、4°Cにて水で5倍に希釈し、測定に用いた。

測定条件は以下の通りである:

装置:JASCO J-820装置に PTC-423L 温度制御装置を装着して使用

セル長:0.5 mm

測定波長:210–260 nm

データ取り込み:0.2 nm毎

スキャン速度:50 nm/min

レスポンス:2秒

データ積算:3回

感度:100 mdeg

測定温度、4、30、40、50、60、70°C

[0032] 結果を図4に示す。超分子の低温におけるスペクトルは、225 nmに正のシグナルをもち、典型的なコラーゲン3本らせん構造のスペクトルパターンを示した。ペプチドユニットのデザイン上、ユニット単分子では、3本らせん構造を取り得ないため、この結果は、ユニット分子間での3本らせん形成(=超分子形成)が起こっていると解釈される。また、225 nmにおける残基平均モル権円率([ $\Theta$ ]mrw)の値が、天然のコラーゲンおよびコラーゲンモデルペプチド3本らせんのそれと同等であることから、超分子中の3本らせん含有率は極めて高いことが示唆される。この3本らせん構造は熱により変

性し、ランダムコイル構造となる。

[0033] 2) 限外濾過による超分子の解析

超分子ストック溶液あるいは、コントロールとして同様に4°Cにて3本らせん形成させた(Pro-Hyp-Gly)<sub>8</sub>-アミドを4°Cにて水で20倍に希釈した。これらをMicrocon YM-100(分子量100,000カット)を用いて4°Cにて限外濾過をおこなった。濾液をHPLCで分析し、そのピーク面積より限外濾過膜透過率をもとめた。また、同じ溶液を95°C、5分間処理することにより3本らせんを熱変性させた直後のサンプルについても、同様に透過率を求めた。結果を図5に示す。

[0034] 超分子形成させたペプチドのほとんど(6%)は限外濾過膜を通過しなかった。一方同じペプチド鎖長とほぼ同様のアミノ酸構成からなる、(Pro-Hyp-Gly)<sub>8</sub>-アミドはその56%が膜を通過した。また、超分子溶液を熱変性することにより、91%が膜を通過できるようになった。このことから、超分子溶液中では、分子間の相互作用(3本らせん形成)による大きな構造体が生じていると解釈される。

#### 実施例 4

[0035] スタガー3量体の合成および特性決定

実施例1のペプチド3量体ユニットと同じPro-Hyp-Gly繰り返しを基本配列とする分子デザインであって、ただしジスルフィド架橋の位置が異なるペプチド3量体(スタガー3量体)を合成した。図6にその構造を示す。

[0036] ペプチド単量体として、以下の3種類のペプチドを用いた:

H-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Cys(SH)-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-OH (配列番号4)

H-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Cys(Acm)-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Cys(SH)-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-OH (配列番号5)

H-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Cys(SH)-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-OH (配列番号6)

[0037] 実施例1と同じ方法により3量体を合成し、質量分析により目的物が合成されたことを確認した。このスタガー3量体を実施例2と同様に低温下で超分子化し、円二色性スペクトルを測定したところ、実施例2(図4)とほぼ同じ結果が得られた。

[0038] 次に、スタガー3量体のストック水溶液(10mg／mL)を4°Cの水で12倍に希釈したのち、4°Cで1時間放置したサンプルについて、粒度分布を測定した。測定は、島津レーザ回折式粒度分布測定装置(SALD-700)を用い、4°Cでレーザ波長405nmで行った。結果を図7に示す。約0.5および約10ミクロンの粒径をあたえる超分子構造体が検出された。

## 請求の範囲

[1] 式:

$-\text{(-Gly-X-Y-)}-$

[式中、XおよびYは任意のアミノ酸残基を表す]

の繰り返し単位を基本構造として有する同一鎖長の3個のペプチドが、主鎖方向に互いにずれて結合されているペプチド3量体。

[2] 前記3個のペプチドがジスルフィド結合により互いに結合されている、請求項1記載のペプチド3量体。

[3] 前記3個のペプチドのうち、2個がそれぞれ1つのCys残基を有し、他の1個が2つのCys残基を有する、請求項1または2に記載のペプチド3量体。

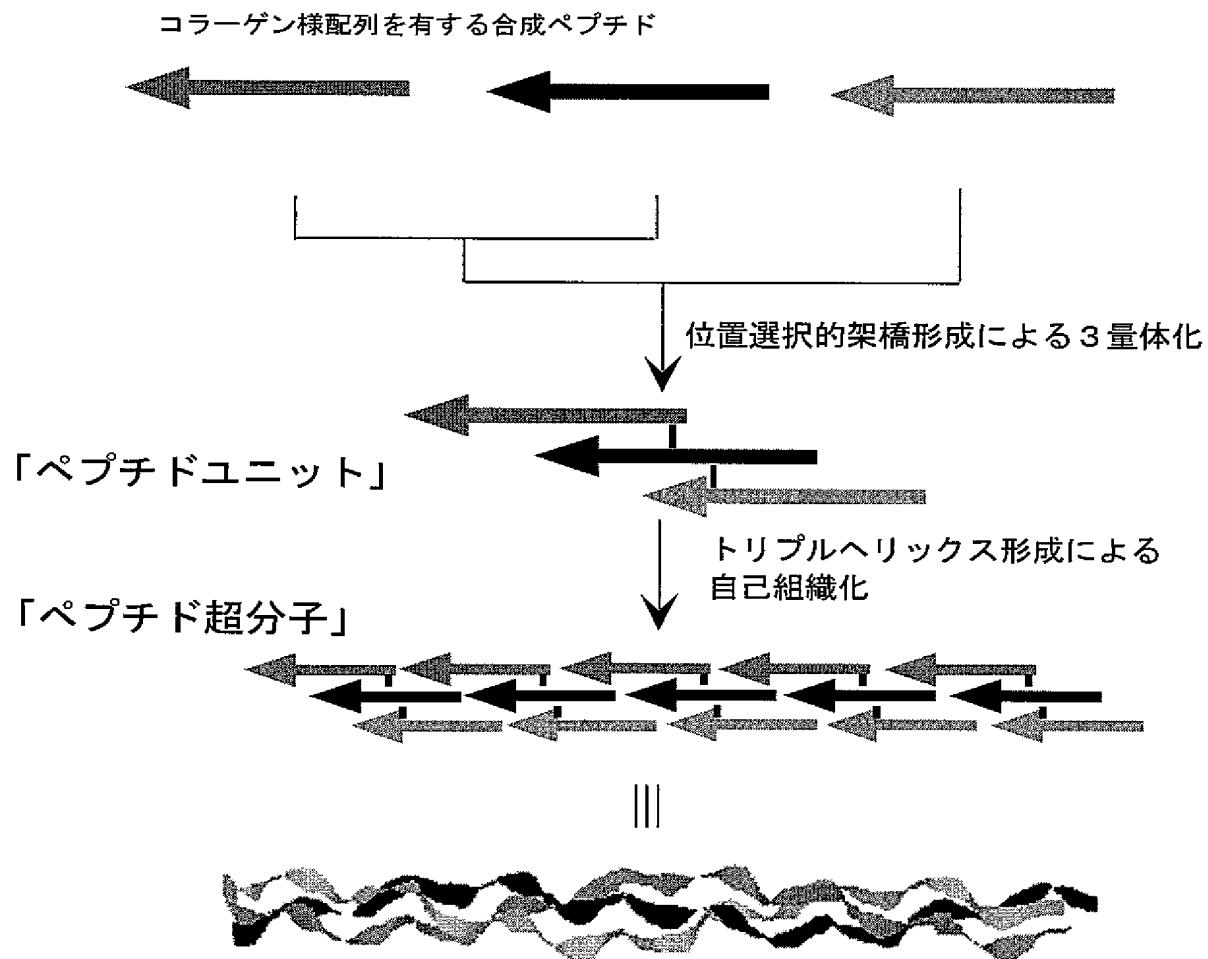
[4] 前記ペプチド3量体分子全体で、Xの30%以上がProであり、Yの30%以上がProまたはHypである、請求項1-3のいずれかに記載のペプチド3量体。

[5] 請求項1記載のペプチド3量体を製造する方法であって、  
1個のCysを有する第1のペプチド、2個のCysを有し、その一方のSH基が保護されている第2のペプチドおよび1個のCysを有する第3のペプチドを用意し、  
第1のペプチドと第2のペプチドとをジスルフィド結合により結合させてペプチド2量体を形成し、  
第2のペプチドの保護されているSHを保護基変換により活性化し、そして  
前記ペプチド2量体と第3のペプチドとをジスルフィド結合により結合させる、  
の各工程を含む方法。

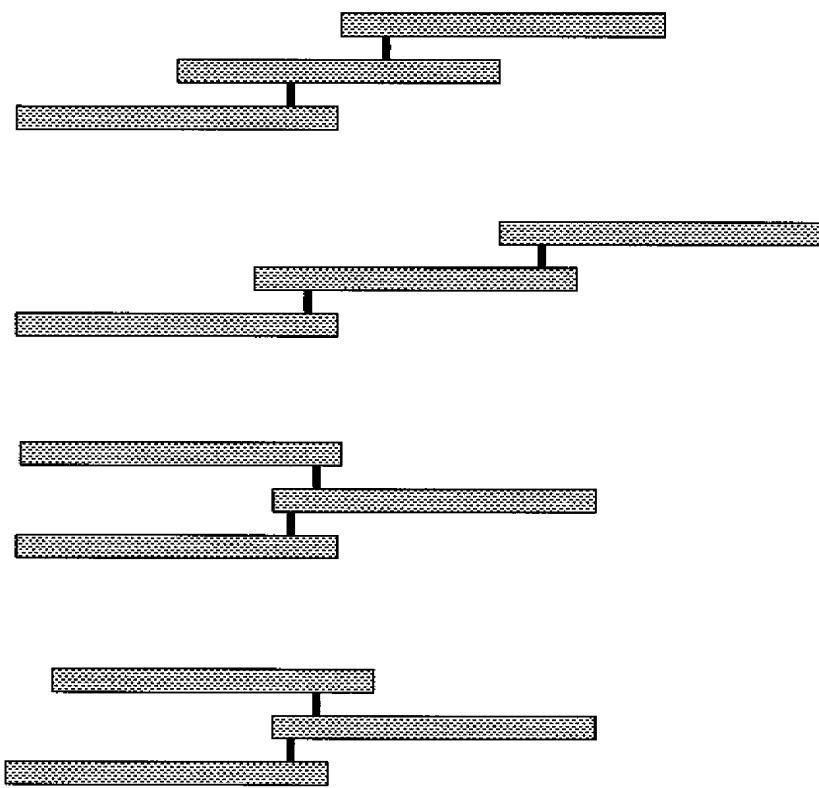
[6] 請求項1-4のいずれかに記載のペプチド3量体を構成成分とし、3本らせん構造を有する分子集合体。

[7] 請求項6に記載の分子集合体を製造する方法であって、請求項1-4のいずれかに記載のペプチド3量体の溶液を0°C-40°Cの温度で1時間以上放置することを特徴とする方法。

[図1]



[図2]

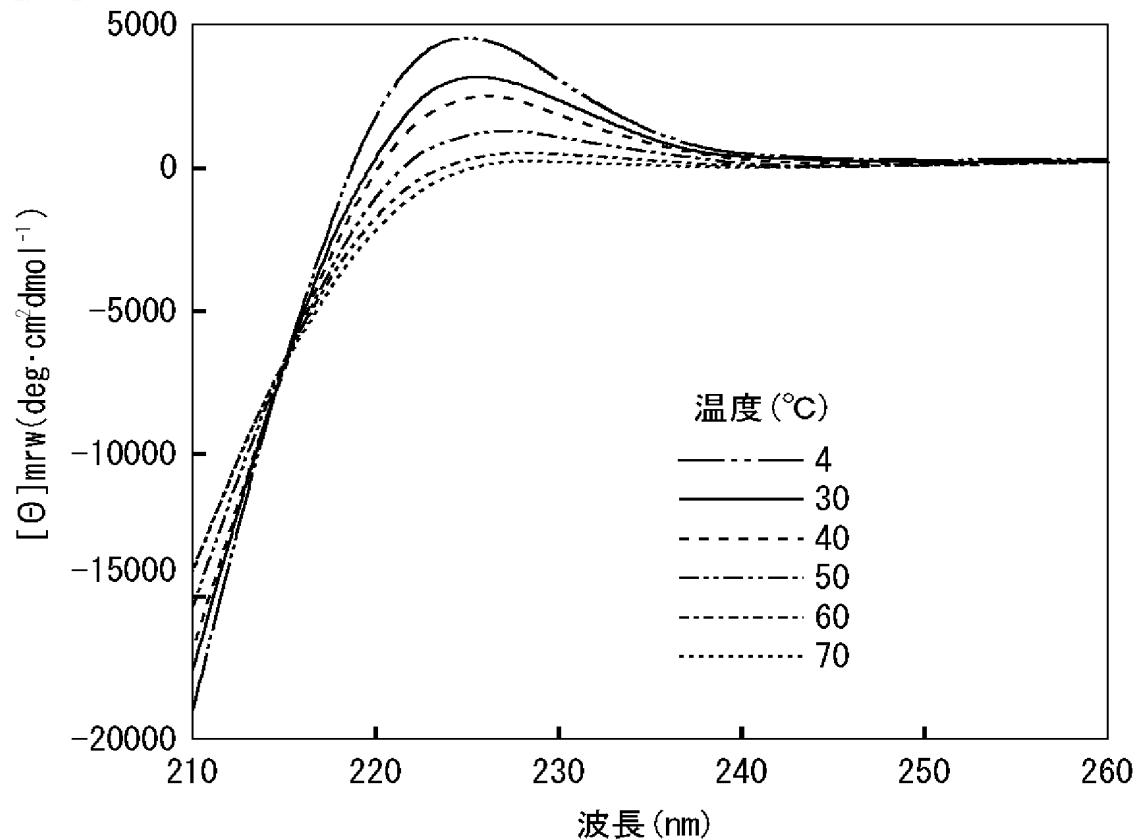


[図3]

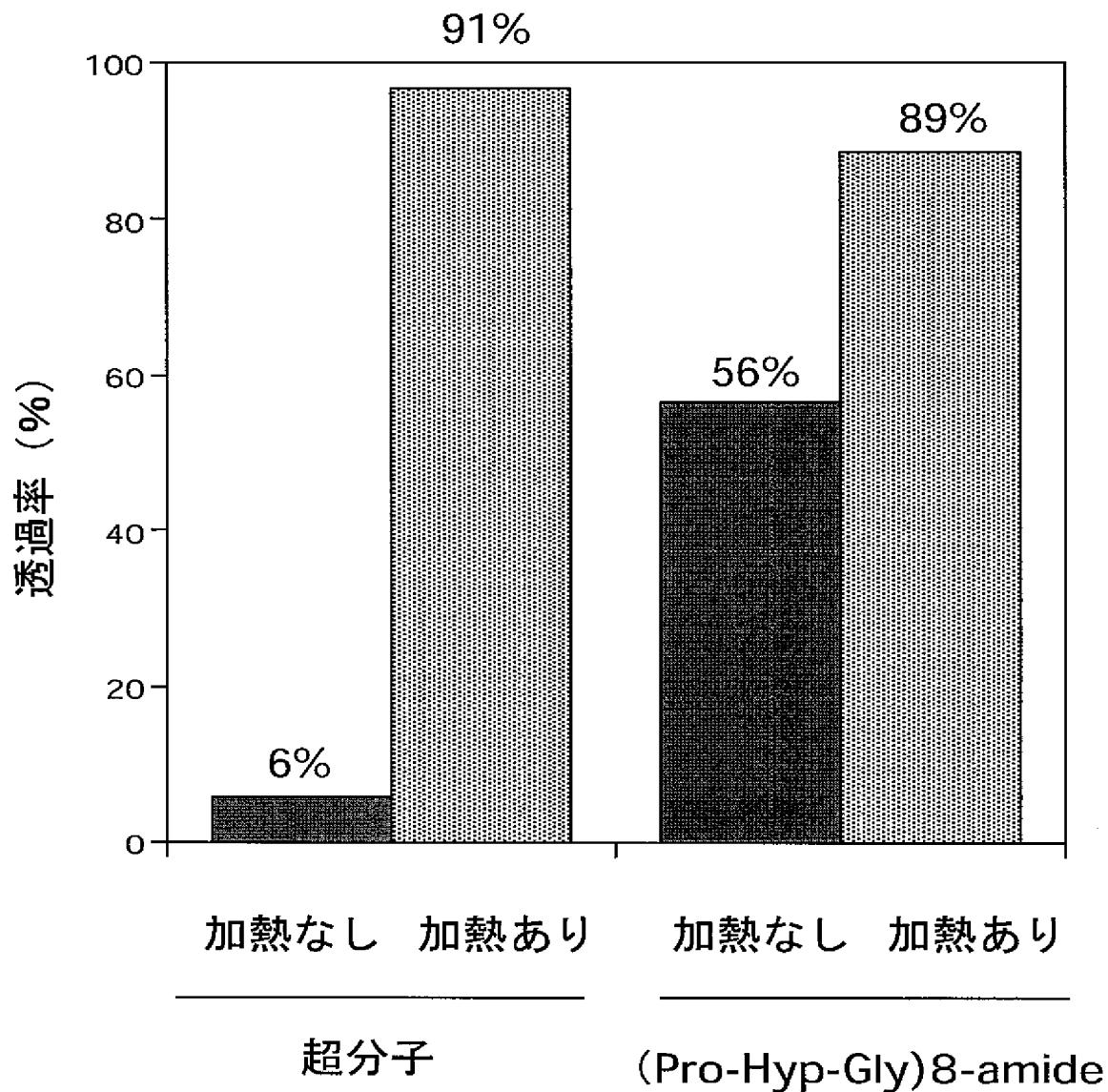
### 3量体型ペプチドユニット

自己集合

[図4]



[図5]

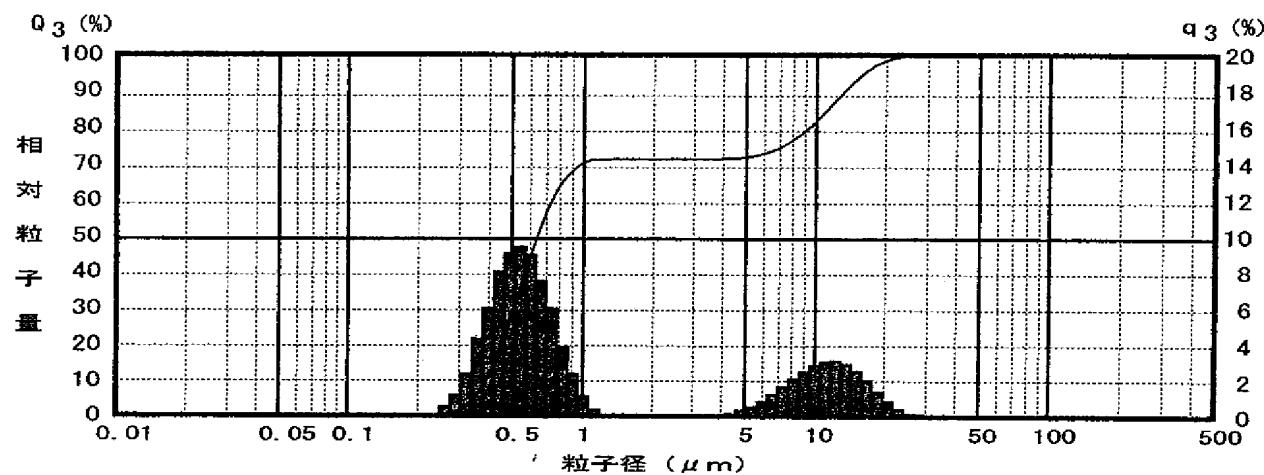


[図6]

The diagram illustrates a repeating sequence of characters. It consists of three identical vertical columns of text, each starting with the character 'O'. The first column ends with 'OGPOGP', the second with 'OGPOGPOGP', and the third with 'OGPOGCOGPOGP'. Each column is preceded by a vertical line, and the lines between the columns are connected by a single horizontal line, indicating that the sequence repeats indefinitely.

OGPOGP  
OGPOGPOGP  
OGPOGCOGPOGP

[図7]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001583

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/78, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/78, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), JSTPlus (JOIS)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-514189 A (Wisconsin Alumni Research Foundation), 11 September, 2001 (11.09.01), Full text & WO 99/10381 A1 & US 5973112 A & EP 1007568 A1	1, 4, 6, 7 2, 3, 5
Y	JP 10-500298 A (Medical Research Council), 13 January, 1998 (13.01.98), Page 19, lines 18 to 23 (xiii) & WO 95/31540 A1 & EP 757720 A1 & US 6190886 B1	2, 3, 5

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 March, 2005 (24.03.05)

Date of mailing of the international search report  
12 April, 2005 (12.04.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1. 7 C12N15/09, C07K14/78, C12P21/02

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1. 7 C12N15/09, C07K14/78, C12P21/02

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2005年

日本国実用新案登録公報 1996-2005年

日本国登録実用新案公報 1994-2005年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)

BIOSIS (STN)

JST Plus (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2001-514189 A (ウイスコンシン アラムニ リサーチ ファンデーション) 2001. 09. 11, 全文	1、4、6、7
Y	& WO 99/10381 A1 & US 5973112 A & EP 1007568 A1	2、3、5
Y	JP 10-500298 A (メディカル リサーチ カウンシル) 1998. 01. 13, 第19頁第18-23行目の (xi) 欄 & WO 95/31540 A1 & EP 757720 A 1 & US 6190886 B1	2、3、5

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

24. 03. 2005

## 国際調査報告の発送日

12.4.2005

## 国際調査機関の名称及び先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

植原 克典

4B 9840

電話番号 03-3581-1101 内線 3446